

비소세포폐암 환자에서 E6 발암단백 발현

대구가톨릭대학교 의과대학 내과학교실

조정남, 윤소연, 현대성

E6 Oncoprotein Expression in Non-Small Cell Lung Cancer Patients

Jung Nam Cho, M.D., So Yeon Yoon, M.D., Dae Sung Hyun, M.D.

Department of Internal Medicine, The Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu, Korea

Background: Lung cancer is the leading cause of cancer deaths in the world. Human papillomavirus (HPV) infection and E6 oncoprotein expression are known risk factors for the development of non-small cell lung cancer (NSCLC). This study was performed to evaluate the prevalence of HPV 16/18 E6 oncoprotein expression in patients with NSCLC.

Methods: Immunohistochemical stains of the HPV 16/18 E6 oncoprotein were performed in tumor tissues from 68 patients with NSCLC who underwent curative surgery from March 2006 to November 2008.

Results: The E6 oncoprotein was expressed in 29.4% of patients with NSCLC and a statistical analysis revealed that E6 oncoprotein expression was significantly higher in females ($p=0.028$), never smokers ($p=0.045$), and patients with adenocarcinoma ($p=0.022$) than that in other patients.

Conclusion: The E6 oncoprotein was expressed in 29.4% of patients with NSCLC. Further studies detecting HPV infection and E6 oncoprotein expression in never smoking patients with NSCLC are needed.

Key Words: Lung Neoplasms; oncogene protein E6, human papillomavirus type 18

서 론

한국인의 폐암 발생 빈도는 2008년 국가암정보센터의 자료에 따르면 전체 악성 종양 중 위암, 갑상샘암, 대장암에 이어 4위이고 전체 암사망률의 21.5%를 차지하여 사망률 1위이다¹. 폐암의 가장 중요한 위험인자는 흡연이며, 전 세계적으로 폐암환자의 약 90%는 흡연과 연관이 있다². 선진국에서는 금연운동으로 남성 흡연인구가 감소함으로써 남성에서 폐암의 유병률은 낮아지고 있는 반면, 여성 흡연인구가 늘면서 여성에서의 유병률은 오히려 증가하고 있다. 그러나 폐암환자 중 전 세계적으로 약 10%는

흡연과 관련이 없고, 대만의 보고에 의하면 여성 폐암환자 중 90%가 흡연과 관련이 없었으며, 조직학적으로는 선암이 월등히 많았다^{3,4}. 이러한 사실은 폐암의 발생에 있어서 흡연 이외의 다른 원인들이 관여함을 간접적으로 시사한다^{5,6}.

인유두종 바이러스(Human Papillomavirus, HPV)는 자궁경부, 상기도 점막에 발생하는 상피암종의 원인으로 알려져 있고, 폐암조직에서도 발견되고 있어 HPV의 감염이 폐암의 발생에 중요한 역할을 할 수 있음이 제기되었다. 여러 HPV 아형 중 약 15개의 아형들이 자궁경부종양 발생과 관련이 있는 것으로 밝혀졌으며, HPV는 감염부위, 혹은 감염을 일으키는 병변의 종류에 따라 양성 종양의 일종인 유두종을 일으키는 저위험군(HPV 6, 11 등)과 상피암종을 일으키는 고위험군(HPV 16, 18 등)으로 나뉜다. HPV에 의한 자궁경부암의 발생기전으로는 고위험군인 HPV 16/18 DNA가 숙주의 염색체에 통합되어 E6 발암단백이 발현되고, E6 발암단백은 종양억제 단백질인 p53과 결합하여 그 기능을 억제함으로써 정상적인 세포주기 및

Address for correspondence: Dae Sung Hyun, M.D.

Department of Internal Medicine, The Catholic University of Daegu School of Medicine, 3056-6, Daemyung 4-dong, Nam-gu, Daegu 705-718, Korea

Phone: 82-53-650-4212, Fax: 82-53-622-2072

E-mail: hdsomn@cu.ac.kr

Received: Jul. 6, 2011

Accepted: Oct. 3, 2011

조절작용을 파괴한다^{7,8}. 자궁경부암과 관련이 있는 HPV 16 아형과 18 아형이 폐암조직에서도 확인되는데, 여성 흡연인구가 적은 대만의 경우 암이 아닌 대조군에서는 HPV 16/18 DNA 양성률이 11%인데 비하여, 폐암환자에서는 양성률이 55%에 이른다⁹. HPV가 폐조직에 도달하는 경로는 아직 잘 알려져 있지 않다. 다만 HPV의 특정 아형이 자궁경부암과 구강의 편평상피세포암과 연관이 있기 때문에 특정한 성관계에 의해 자궁경부에서 구강으로, 그리고 후두와 폐로 전파되었을 가능성이 있다¹⁰. HPV에 의한 폐감염의 또 다른 경로는 혈행성 전파이다. 최근의 연구에 의하면 HPV E6 mRNA가 진행성 자궁경부암환자의 말초혈액에서 검출되었으며 이것은 HPV감염이 자궁경부에서 시작되었고 혈액을 통하여 폐조직으로 전파되었음을 의미한다¹¹. 자궁경부암의 발생빈도가 높은 우리나라에서도 HPV감염 및 E6 발암단백의 발현이 폐암의 발생과 연관성을 보일 것으로 생각된다.

본 연구는 본원에서 진단되고, 수술된 비소세포폐암 조직에서 HPV 16/18 E6 발암단백의 발현율을 확인하고 성별, 나이, 흡연력, 조직형, 재발유무와 같은 인자들과의 연관성을 알아보고자 시행되었다.

대상 및 방법

1. 대상 환자

2006년 3월부터 2008년 11월까지 대구가톨릭의료원에서 원발성 비소세포폐암으로 진단받고 근치적 절제술을 시행한 환자 68명을 대상으로 성별, 나이, 흡연력, 조직형, 재발유무 등을 분석하였다.

2. HPV 16/18 E6 발암단백 면역조직화학 염색

포르말린 고정 및 파라핀 포매 조직을 자일렌으로 파라핀을 제거하고, 100%, 90%, 80% 및 70% 에탄올에 연속적으로 재수화시켰다. 이후 내인성 과산화효소 작용을 차단하기 위해 과산화수소수로 처리하였다. 조직의 고정과 파라핀 포매 과정에서 감춰졌던 항원을 노출시키고 복구하기 위해 각 절편을 구연산 완충액(pH 6.0)에 담근 후 마이크로파로 5분간 두 번씩 처리하였다. HPV 16 E6 또는 HPV 18 E6 발암단백의 발현을 보기위해 단클론항체 (HPV16 E6/18 E6 (CIP5)[®]; Santa Cruz, CA, USA)를 떨어뜨리고 25°C에서 90분간 반응시켰고 발색시약으로 Streptavidin peroxidase를 사용하여 hematoxylin으로 대조 염색하였다. 면역조직화학 염색판정은 염색 양성 세포의 발

현비율에 따라 분류하였다. 양성 세포가 0~10%인 경우 음성으로 판정하였고 10% 이상인 경우를 양성으로 판정하였다. HPV 16 양성 자궁경부종양 조직을 양성 대조군으로, 항체 대신 항체희석버퍼를 음성 대조군으로 사용하였다.

3. 통계 분석

통계처리를 통하여 성별, 연령(65세 미만, 65세 이상), 흡연력, 폐암의 조직형 및 재발유무와 HPV 16/18 E6 발암단백 발현과의 상관관계를 Chi-square test를 통해 알아보았다. p값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 대상 환자의 특성

전체 68명의 환자 중 남자가 47명(69.1%), 여자가 21명(30.9%)이었다. 평균연령은 63.7세였고 65세 미만이 31명(45.6%), 65세 이상이 37명(54.4%)이었다. 현재흡연자는 26명(38.2%), 과거흡연자는 20명(29.4%), 비흡연자는 22명(32.4%)으로 흡연력이 있는 환자는 전체 폐암환자의 67.6%였다. 68명 중 선암은 40명(58.8%)이었고 수술 후 7명(10.3%)에서 재발하였다(Table 1). 성별에 따른 흡연력은 남녀 각각 95.7%, 4.8%였다. 편평상피세포암환자 28명 모두 흡연력이 있었고, 선암환자 40명 중 18명(45.0%)의 환자들이 흡연력이 있어, 선암에서 흡연자의 비율은 상대적으로 낮았다($p < 0.000$).

2. 폐암관련 동반질환과 병력

전체 68명 중 26명(38.2%)에서 폐암관련 동반질환 혹은 병력이 있었고, 65세 미만의 환자 41.9%와 65세 이상의 환자 35.1%가 폐암관련 동반질환 혹은 병력이 있었다. 65세 미만, 65세 이상 모두에서 만성 폐쇄성 폐질환이 각각 22.6%, 24.3%로 가장 많았으며, 만성 폐쇄성 폐질환 다음으로 65세 미만에서는 암병력(16.1%), 폐결핵병력(3.2%)순이었고, 65세 이상에서는 암병력(13.5%), 폐결핵병력(10.8%) 순으로 나타났다.

3. 조직학적 분류

전체 68명 중 선암이 40명(58.8%), 편평상피세포암이 28명(41.2%)이었다. 65세 미만에서는 선암이 22명(70.9%), 65세 이상에서는 18명(48.6%)이었다. 여자환자 21명 모

Table 1. Relationship between human papillomavirus (HPV) 16/18 E6 oncoprotein expression and clinicopathological variables

| Variable | Frequency | HPV16/18 E6 oncoprotein expression | | p-value |
|----------------|-----------|------------------------------------|-----------|---------|
| | | Positive | Negative | |
| Total | 68 (100) | 20 (29.4) | 48 (70.6) | |
| Gender | | | | 0,028 |
| Male | 47 (69.1) | 10 (14.7) | 37 (54.4) | |
| Female | 21 (30.9) | 10 (14.7) | 11 (16.2) | |
| Age, yr | | | | 0,637 |
| <65 | 31 (45.6) | 10 (14.7) | 21 (30.9) | |
| ≥65 | 37 (54.4) | 10 (14.7) | 27 (39.7) | |
| Smoking habit | | | | 0,045 |
| Yes | 46 (67.6) | 10 (14.7) | 36 (52.9) | |
| No | 22 (32.4) | 10 (14.7) | 12 (17.6) | |
| Histopathology | | | | 0,022 |
| SCC | 28 (41.2) | 4 (5.9) | 24 (35.3) | |
| AD | 40 (58.8) | 16 (23.5) | 24 (35.3) | |
| Cancer recur | | | | 0,410 |
| Yes | 7 (10.3) | 3 (4.4) | 4 (5.9) | |
| No | 61 (89.7) | 17 (25.0) | 44 (64.7) | |

Values are presented as number (%).

SCC: squamous cell carcinoma; AD: adenocarcinoma.

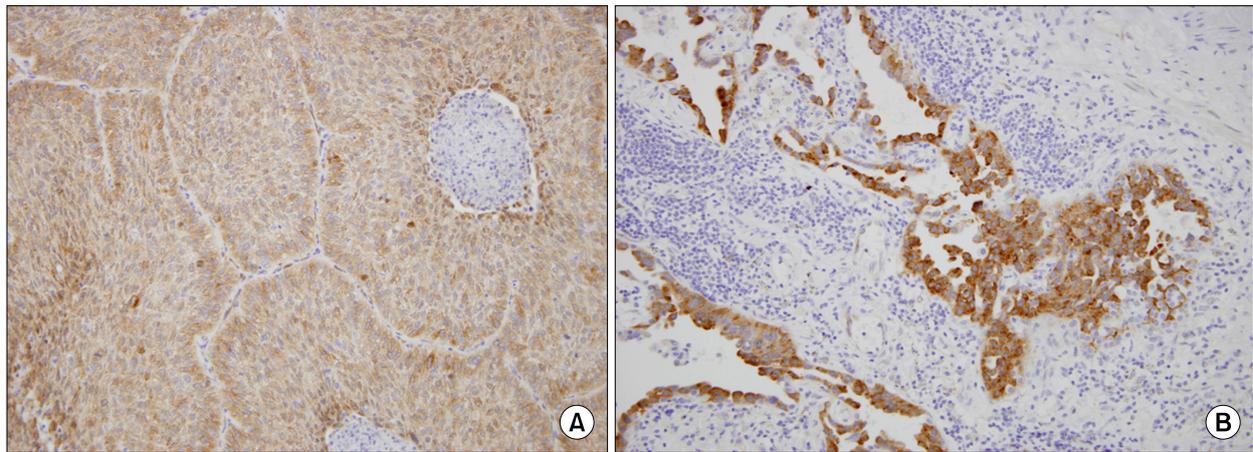


Figure 1. Immunohistochemical staining for human papillomavirus (HPV) 16/18 E6 oncoprotein in lung tumors. The E6 oncoprotein was expressed in squamous cell carcinoma (A, $\times 400$) and adenocarcinoma (B, $\times 400$).

두 선암이었고, 남자환자는 47명 중 19명(40.4%)에서 선암으로 나타나, 남녀 간의 조직학적 차이가 있었다($p < 0.000$).

4. HPV 16/18 E6 발암단백 발현

전체 68명 중 20명(29.4%)에서 HPV 16/18 E6 발암단백 발현이 확인되었다(Figure 1). 남성 47명 중 10명

(21%), 여성 21명 중 10명(48%), 흡연자 46명 중 10명(22%), 비흡연자 22명 중 10명(46%), 편평상피세포암 28명 중 4명(14%), 선암 40명 중 16명(40%)에서 E6 발암단백이 발현되어 여성($p=0.028$), 비흡연자($p=0.045$), 선암($p=0.022$)에서 유의하게 높았으며 나이와 암의 재발여부와는 차이가 없었다(Table 1).

고 찰

HPV는 Papovaviridae family에 속하는 이중 나선상 DNA 바이러스로 직경이 55 nm인 20면체의 외곽을 가지며 그 속에 약 7,900개의 염기쌍으로 이루어진 원형의 DNA를 포함하고 있다. 현재까지 100여종에 달하는 유전형의 염기서열이 밝혀져 있으며, 약 15개의 아형이 자궁경부종양 발생과 관련이 있다. HPV-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -53, -54, -56, -58, -59, -66과 -68 등은 중증의 자궁경부 이형성과 자궁경부암에서 발견되어 고위험군으로 분류되고, HPV-6, -11, -40, -42, -43과 -44 등은 외음부 표피감염을 일으키는 저위험군으로 분류된다¹². 자궁경부암의 발생기전에 고위험군 HPV감염이 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데, 그 기전은 HPV에 의해 생성되는 E6 발암단백의 발현에 의한 감염세포의 악성 세포전환(malignant transformation)이다. HPV에 encode되어 있는 E6 발암단백은 종양억제 단백질인 p53과 결합하여 그 기능을 억제하고 정상적인 세포주기 및 조절 작용을 파괴한다^{7,8}.

1979년 Syrjanen은 HPV가 편평상피세포폐암의 발생과 연관성이 있음을 처음으로 제안하였고¹³, 이후 연구에서 폐암조직에서 HPV검출률은 연구자마다 매우 다양하게 보고되고 있다. Klein 등¹⁴은 53건의 HPV와 관련된 폐암 논문에서 4,508명의 폐암환자(유럽 1,305명, 아메리카 395명, 아시아 2,808명)를 대상으로 대륙과 지역, 검사방법, 검체종류, HPV 아형, 폐암조직형과 HPV 양성률을 분석하였다. 폐암조직에서 HPV의 평균 검출률은 24.5%였고, 유럽과 아메리카의 평균 검출률이 각각 17%, 15%인 것에 비해 아시아에서는 35.7%로 높았다. 이러한 차이는 검출에 이용된 방법의 차이에 의한 것일 수도 있고, 지리학적인 차이에 의해 아시아에서 높은 빈도를 보였을 가능성도 있으나, 현재까지 전 세계적인 HPV감염의 유행률에 대한 자료는 없는 실정이다. HPV감염의 지리학적인 차이는 성생활 및 환경적 요인과도 관련이 있을 것으로 생각된다¹⁵. 한 예로, HPV감염율이 높았던 Okinawa에서 위생을 개선시키고 난 후 HPV감염율이 매우 감소하였으며 이후 편평상피세포암의 발생률도 감소한 것으로 확인되었다¹⁶. 이처럼 HPV는 인간의 폐암조직에서 전 세계적으로 발견이 되나 아시아지역에서 훨씬 빈도가 높으며, 편평상피세포암뿐 아니라 다른 아형의 폐암에서도 발견되며, 고위험 아형의 HPV뿐 아니라 저위험 아형의 HPV도 일부 편평상피세포암에서 관찰된다^{14,17,18}.

폐암의 발생과 HPV에 대해 시행되었던 연구들은 HPV가 폐암에서 잠재적으로 중요한 위험인자이거나 원인이 될 수 있음을 보여주었고, 그 기전으로 HPV E6 발암단백의 발현이 관련 있다. 폐암과 HPV E6 발암단백의 발현과의 관계에 대한 여러 연구들이 있었는데, Kinoshita 등¹⁹은 32명의 폐암환자 조직에서 HPV E6 발암단백 유무를 보았는데, 편평상피세포암의 10% (1/10)에서, 선암의 9% (2/22)에서 HPV 18 E6 mRNA를 검출하였으나 HPV 16 E6 mRNA는 검출되지 않았다. Ciotti 등²⁰은 파라핀고정 없이 신선 비소세포폐암 조직 6예 중 5예에서 HPV 16 E6 발암단백 염기서열을 검출하였다. Hsu 등²¹은 비소세포폐암환자 217명 중 49명(22.6%)에서 HPV 16 E6 발암단백이 발현됨을 보고하였고, 31명(14.3%)에서 HPV 18 E6 발암단백이 발현됨을 보고하였으며, 여자, 비흡연자, 선암에서 HPV 16 E6 발암단백과 HPV 18 E6 발암단백의 발현이 유의하게 높음을 보고하였다. 본 연구에서는 68명 중 20명(29.4%)의 폐암조직에서 HPV 16/18 E6 발암단백이 발현되었으며, 여자, 비흡연자, 선암에서 E6 발암단백의 발현이 유의하게 높았고, 이것은 비흡연 여성에서 선암의 발생이 E6 발암단백의 발현과 중요한 연관성이 있을 가능성을 시사한다. 대만의 연구를 보면 122명의 폐암환자 조직 중 45.9% (56예)에서 HPV 16 DNA 양성하였고, 이러한 양성 환자의 60.7% (34예)에서 E6 발암단백이 발현되었고, HPV 16 DNA 음성인 66명의 폐암조직에서는 E6 발암단백이 한 예도 관찰되지 않았다⁹. E6 발암단백 발현 유무와 비소세포폐암환자의 수술 후 재발이나 생존율에 대한 연구는 아직 제한적이다. Hsu 등²¹은 E6 발암단백 발현과 5년 생존율에 대한 상관관계를 비교하였다. 비소세포폐암 1명기 환자를 대상으로 했을 때, E6 발암단백이 발현된 환자의 5년 생존율은 72.2%였고, 발현되지 않은 환자들의 5년 생존율은 48.3%로 E6 발암단백이 발현된 환자에서 의미 있게 높았다. 몇몇 두경부상피세포암(Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, HNSCC) 환자를 대상으로 한 연구에서도 HPV 양성 환자들이 음성 환자들보다 예후가 좋은 것으로 확인된 바 있다²²⁻²⁵. 그 기전은 명확하지는 않지만, 방사선치료 반응성 증가, 면역체계에서 바이러스항원 감시, 비흡연자에서 field cancerization의 부재 등의 영향으로 생각된다²⁶. 본 연구에서는 E6 발암단백 발현과 수술 후 폐암의 재발여부에 대해 분석하였다. E6 발암단백이 발현된 환자 20명 중 3명, 발현되지 않은 환자 48명 중 4명에서 폐암의 재발을 확인하였으나, E6 발암단백의 발현과 암의 재발 사이에 유의한 상관관계는

발견할 수 없었다.

결론적으로, 현재까지의 연구결과들을 보면 HPV감염 및 E6 발암단백 발현이 비흡연자 폐암 발생에 있어서 위험인자가 될 것으로 생각된다. 본 연구결과도 폐암조직에서 E6 발암단백 발현이 일부 환자에서 관찰되어 그러한 가능성을 뒷받침 할 수 있는 결과를 보였다. 그러나 우리나라에서는 이에 대한 연구가 아직 충분하지 않기 때문에 보다 표준화되고 정확한 방법으로 HPV감염 및 E6 발암단백 발현과 폐암과의 상관관계를 밝히기 위해 더 많은 연구가 필요할 것이다.

감사의 글

This study was supported by research funds from The Catholic University of Daegu Research Institute of Medical Sciences.

참 고 문 헌

- National Cancer Information Center (NCIC). Cancer mortality rates 2009 [Internet]. Goyang: NCIC; c2011 [cited 2011 Nov 03]. Available from: <http://www.cancer.go.kr/cms/statics/mortality/index.html>.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74-108.
- Ko YC, Cheng LS, Lee CH, Huang JJ, Huang MS, Kao EL, et al. Chinese food cooking and lung cancer in women nonsmokers. *Am J Epidemiol* 2000;151:140-7.
- Chen CJ, Wu HY, Chuang YC, Chang AS, Luh KT, Chao HH, et al. Epidemiologic characteristics and multiple risk factors of lung cancer in Taiwan. *Anticancer Res* 1990;10:971-6.
- Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. Lung cancer in never smokers--a different disease. *Nat Rev Cancer* 2007;7:778-90.
- Cheng YW, Chiou HL, Sheu GT, Hsieh LL, Chen JT, Chen CY, et al. The association of human papillomavirus 16/18 infection with lung cancer among nonsmoking Taiwanese women. *Cancer Res* 2001;61:2799-803.
- Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990;248:76-9.
- Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990;63:1129-36.
- Cheng YW, Wu MF, Wang J, Yeh KT, Goan YG, Chiou HL, et al. Human papillomavirus 16/18 E6 oncoprotein is expressed in lung cancer and related with p53 inactivation. *Cancer Res* 2007;67:10686-93.
- Chen YC, Chen JH, Richard K, Chen PY, Christiani DC. Lung adenocarcinoma and human papillomavirus infection. *Cancer* 2004;101:1428-36.
- Tseng CJ, Pao CC, Lin JD, Soong YK, Hong JH, Hsueh S. Detection of human papillomavirus types 16 and 18 mRNA in peripheral blood of advanced cervical cancer patients and its association with prognosis. *J Clin Oncol* 1999;17:1391-6.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12-9.
- Syrjänen KJ. Condylomatous changes in neoplastic bronchial epithelium. Report of a case. *Respiration* 1979;38:299-304.
- Klein F, Amin Kotb WF, Petersen I. Incidence of human papilloma virus in lung cancer. *Lung Cancer* 2009;65:13-8.
- Skegg DC, Corwin PA, Paul C, Doll R. Importance of the male factor in cancer of the cervix. *Lancet* 1982;2:581-3.
- Okinawa Prefectural Government. Annual statistical report of health and environment 1986-1995. Okinawa: Okinawa Prefectural Government;1995.
- Miasko A, Niklińska W, Nikliński J, Chyczewska E, Naumnik W, Chyczewski L. Detection of human papillomavirus in non-small cell lung carcinoma by polymerase chain reaction. *Folia Histochem Cytobiol* 2001;39:127-8.
- Miyagi J, Tsuhako K, Kinjo T, Iwamasa T, Hirayasu T. Recent striking changes in histological differentiation and rate of human papillomavirus infection in squamous cell carcinoma of the lung in Okinawa, a subtropical island in southern Japan. *J Clin Pathol* 2000;53:676-84.
- Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Shindoh M, Fujino M, Akie K, Kato M, et al. Human papillomavirus type 18 DNA and E6-E7 mRNA are detected in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung. *Br J Cancer* 1995;71:344-9.
- Ciotti M, Giuliani L, Ambrogi V, Ronci C, Benedetto A, Mineo TC, et al. Detection and expression of human papillomavirus oncogenes in non-small cell lung can-

- cer. *Oncol Rep* 2006;16:183-9.
21. Hsu NY, Cheng YW, Chan IP, Ho HC, Chen CY, Hsu CP, et al. Association between expression of human papillomavirus 16/18 E6 oncoprotein and survival in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2009;21:81-7.
 22. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:709-20.
 23. Ritchie JM, Smith EM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang D, Klussmann JP, et al. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Int J Cancer* 2003;104:336-44.
 24. Lindel K, Beer KT, Laissue J, Greiner RH, Aebersold DM. Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer* 2001;92:805-13.
 25. Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, Kowalski D, Harigopal M, Brandsma J, et al. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol* 2006;24:736-47.
 26. Fakhry C, Gillison ML. Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. *J Clin Oncol* 2006;24:2606-11.